

The renin-angiotensin system and arteriolar growth : consequences of vascular architecture for the development of hypertension

Citation for published version (APA):

le Noble, F. A. C. (1996). The renin-angiotensin system and arteriolar growth : consequences of vascular architecture for the development of hypertension. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1996

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In the general introduction (chapter 1) the main hypotheses about the genesis of essential hypertension are reviewed. These hypotheses point towards a primary role for functional and structural changes of the vasculature, in the genesis and maintenance of the increased peripheral resistance, and therefore the high blood pressure in essential hypertension. A change in vascular architecture, specifically, a decrease in the number of available vessels (both arterioles and capillaries) to carry flow, rarefaction, has been implicated to be the initiating event causing the increase in peripheral resistance. The vascular bed arises during early embryogenesis from the processes vasculogenesis and angiogenesis. Thereafter, the architecture of a vascular bed can be dynamically regulated depending on the perfusion status (pressure and flow), metabolic demand and the release of local growth factors. The factors that may influence formation and modulation of vascular architecture are briefly discussed. Restoring vascular architecture in essential hypertension by means of administration of microvascular growth factors may provide a useful clinical approach in the early treatment of essential hypertension. Given the putative role of the renin-angiotensin system in vascular development, drugs influencing this system are possible candidates.

Chapter 2 provides experimental evidence showing that angiotensin-II can stimulate microvascular growth in the chick embryo chorio-allantoic (CAM) angiogenesis assay. This response could only be blocked by the peptidergic AT_2 antagonist CGP42112A. The nonpeptidergic AT_2 antagonist PD123319 and AT_1 antagonist losartan (DuP753) were not effective. Additional biochemical analysis revealed the existence of a single class of AT receptors with a total number of binding sites of 1190 fmol/mg protein and an affinity constant for angiotensin-II of 2.7nM. The inhibitory concentrations (IC_{50}) for CGP42112A, PD123319 and losartan were 724, >100.000, and 59.000nM respectively. These data suggest that the AT receptor mediating microvascular growth is different from the AT_1 and AT_2 receptor.

The arteriolar branching pattern in the chick embryo chorio-allantoic membrane is in general dichotomous. It was observed that angiotensin-II and angiotensin-II in combination with losartan changed this pattern and induced the formation of arteriolar-arteriolar connections, arcades. Arcades may be formed by acceleration of the arteriolization process, the upgrading of pre-existing capillary tubes into arterioles by investing the capillary wall with vascular smooth muscle cells. Chapter 3 describes a method to quantify arcade formation, and it is shown that interfering with prostaglandin synthesis can mimic the same changes in arteriolar pattern as observed with angiotensin-II and losartan. It is therefore hypothesized that angiotensin-II can stimulate the process of capillary upgrading into arterioles by stimulation of arteriolar smooth muscle cell growth. Prostaglandins normally counteract this effect. After blockade of prostaglandin action, the angiotensin-II induced arteriolization is enhanced, resulting in pronounced arcade formation. The actions of losartan may be related to its inhibitory effects on prostaglandin synthesis or action rather than AT receptor antagonism.

By means of autoradiography (chapter 4), the chick embryo chorio-allantoic AT receptor was localized in the vascular wall of developing arterioles. Cell-types identified to express AT receptors were fibroblasts and vascular smooth muscle cells. The expression of the AT receptor was developmentally regulated and it ran parallel with the vascular growth velocity. These observations are in accordance with the hypothesis that angiotensin-II, either directly, through stimulation of vascular smooth muscle growth, or indirectly, through activation of fibroblasts and subsequently changes in extracellular matrix, can stimulate growth of arterioles.

Growth of capillaries, true angiogenesis, is dependent on endothelial cell proliferation. Using an *in vitro* approach with rat cardiac endothelial cells, it was shown that angiotensin-II can induce endothelial cell growth (chapter 5). This response however, was only evident at low levels (5%, 7.5%) of supplemented growth serum. The endothelial growth stimulating effect of angiotensin-II most likely depended on activation of the AT₁ receptor.

Rarefaction in essential hypertension may be due to hampered outgrowth of the microvascular system. To evaluate the contribution of blood-borne factors to microvascular growth, serum was isolated from both normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) at 6 and 12 weeks, and tested in the CAM angiogenesis assay (chapter 6). The serum angiogenic capacity was transiently increased during early development in WKY versus SHR. The relative decrease of angiogenic factors in SHR serum might therefore contribute to rarefaction.

Chapter 7 attempts to integrate some of the present hypotheses on the hemodynamic consequences of arteriolar growth. To evaluate the effects of arteriolar growth on resistance to flow, a computer model was constructed (S-model) that could vary addition of new arteriolar segments with the position in the growing tree. Growth of arterioles along existing segments, segmental growth, resulted in slight reduction in resistance. However, growth of arterioles at the terminal part of the arteriolar network, terminal growth, increased resistance.

Based on *in vivo* vessel length and diameter measurements, resistance to flow of the developing CAM arteriolar tree (day 7- day 14) could be calculated. The calculated resistance to flow decreased 2% in the period day 7-10, and 12% in the period day 10-14. Topological analysis of the same developing CAM arteriolar tree revealed that the growth process started with segmental growth and within time converged towards terminal growth. Based on these data it was concluded that the change in the calculated resistance to flow during the period day 7-10 may be explained by the topological growth pattern, whereas during the period day 10-14, change in resistance is mainly dependent on an increase in arteriolar lumen diameter. It is postulated that the differential topological patterns of arteriolar growth are determined by a time-varying contribution of transmural pressure (early) and flow or metabolic influences (late) on vascular growth.

The thesis ends with a discussion about the putative role of the renin-angiotensin system in vascular development (chapter 8). The implications of changes in the regulation of vascular development for resistance to flow, and the genesis of essential hypertension are discussed.

Samenvatting

Essentiële hypertensie wordt gekenmerkt door een verhoogde bloeddruk, een normaal hart-minuut volume en een verhoogde perifere weerstand. De permanent verhoogde perifere weerstand wordt gezien als de oorzaak voor het ontstaan en in stand houden van de hoge bloeddruk. Hoofdstuk 1 beschrijft de voornaamste hypothesen ten aanzien van het ontstaan essentiële hypertensie. Er wordt gesuggereerd dat zowel functionele als structurele veranderingen in het arteriële vaatbed ten grondslag liggen aan de verhoogde perifere weerstand. Er wordt gepostuleerd dat een afname in het voor perfusie beschikbare aantal bloedvaten (zowel arteriolen als capillairen), rarefaction, mogelijk een rol speelt tijdens de initiële fase in het ontstaan van de verhoogde perifere weerstand. Het vaatbed wordt gevormd tijdens de vroege embryonale fase uit de processen vasculogenese en angiogenese. Na de vorming van het vaatstelsel, kan de architectuur dynamisch aangepast worden afhankelijk van de perfusie-status (druk en flow), metabole vraag, of de aanwezigheid van lokale groeifactoren. Deze processen worden kort bediscussieerd. Herstel van een normale vaatarchitectuur in essentiële hypertensie door het toedienen van groeifactoren voor bloedvaten, is mogelijk klinisch toepasbaar voor het, in een vroege fase, behandelen van essentiële hypertensie. Op basis van de mogelijke rol van het renine-angiotensine systeem in vaatgroei, behoren farmaca die ingrijpen op de werking van dit systeem tot de mogelijke kandidaten.

In hoofdstuk 2 worden de effecten van angiotensine-II en angiotensine-receptor blokkers op microvasculaire groei beschreven. Angiotensine-II bleek instaat vaatgroei te bevorderen. Dit effect kon geblokkeerd worden door de peptiderge AT_2 blokker CGP42112A. Echter, de non-peptiderge AT_1 blokker losartan (DuP753) en AT_2 blokker PD123319, waren niet effectief. Additionele biochemische analyse toonde één type angiotensine receptor aan met een bindingsaffiniteit van 2.7nM voor angiotensine-II en een dichtheid van 1190 fmol/mg eiwit. De IC_{50} voor CGP42112A, losartan, en PD123319 bedroegen respectievelijk 724, > 100.000, en 59.000nM. Hieruit wordt geconcludeerd dat het bloedvatgroei stimulerende effect van angiotensine-II berust op activatie van een AT receptor die afwijkt van de AT_1 en AT_2 receptor.

Het arteriële vertakkingspatroon in de chorio-allantois membraan (CAM) van het kippe-embryo is vrijwel dichotoom. Toediening van angiotensine-II en angiotensine-II in combinatie met losartan resulteerde echter in de vorming van arteriolaire lussen, arcades of anastomoses. Arcades kunnen gevormd worden door het arteriolisatie proces te versnellen.

Hoofdstuk 3 beschrijft een methode om arcade vorming te quantificeren. Er wordt aangetoond dat blokkade van de prostaglandine synthese eenzelfde verandering in arterielaire vertakkingspatroon kan induceren als angiotensine-II en losartan. Er wordt daarom gepostuleerd dat angiotensine-II, door het bevorderen van groei van gladde spiercellen, het opwaarderen van capillairen in arteriolen actief kan stimuleren. Onder normale omstandigheden remmen prostaglandines dit effect. Na blokkade van de prostaglandine synthese valt dit remmende effect weg, en wordt het effect van angiotensine-II op het arteriolisatie proces sterker, resulterende in een verhoogd aantal arcades. Aangezien losartan gevoelige AT receptoren niet aanwezig zijn in het CAM, wordt gepostuleerd dat het effect van losartan het gevolg is van blokkade van prostaglandine synthese of werking.

Hoofdstuk 4 beschrijft een studie waarin, met behulp van autoradiografie, getracht werd de angiotensine receptor in het chorio-allantois membraan van het kippe-embryo, te localiseren. De AT receptor kon gelocaliseerd worden in fibroblasten en gladde spiercellen in de vaatwand van maturende arteriolen. De expressie van de AT receptor was tijdsafhankelijk en liep parallel met de groeisnelheid van de bloedvaten in het CAM. Deze observaties zijn in overeenstemming met de hypothese die stelt dat angiotensine-II, hetzij direct via stimulatie van groei van gladde spiercellen, hetzij indirect door activatie van fibroblasten en vervolgens veranderingen in de extracellulaire matrix, groei van arteriolen kan stimuleren. Groei van capillairen, angiogenese, is afhankelijk van proliferatie van endotheelcellen.

Hoofdstuk 5 beschrijft een in vitro experiment waarbij wordt aangetoond dat angiotensine-II groei van endotheel cellen kan stimuleren. Echter, dit effect was afhankelijk van de gebruikte concentratie (5% en 7.5% foetaal kalfserum) kweekmedium.

Rarefaction zoals geobserveerd in essentiële hypertensie, is mogelijk het gevolg van een verminderde uitgroei van het vaatstelsel. Om te achterhalen of in het bloed circulerende factoren betrokken zijn bij groei van bloedvaten, werd serum geïsoleerd uit normotensieve Wistar Kyoto (WKY) ratten en spontaan hypertensieve ratten (SHR), van respectievelijk 6 en 12 weken oud. De angiogene capaciteit van het serum werd vervolgens getest op het CAM. Hieruit bleek dat de serum angiogene capaciteit van WKY ratten, in vergelijking tot SHR ratten, hoger was. De relatieve afname van circulerende angiogene factoren in SHR serum, draagt mogelijk bij tot het ontwikkelen van rarefaction.

Hoofdstuk 7 integreert de huidige hypothesen aangaande de interactie tussen hemodynamica en de gevolgen voor arteriolaire groei. Voor het bestuderen van de gevolgen van arteriolaire groei op doorbloedingsweerstand werd een computer model ontwikkeld (S-model). Dit model kan additie (groei) van nieuwe arteriolaire segmenten variëren over de plaats in de vaatboom. Additie van arteriolen langs bestaande arteriolen, segmentale groei, resulteerde in een daling van de weerstand. Additie van nieuwe arteriolen aan het terminale deel van het vaatbed resulteerde in een stijging van de weerstand.

Op basis van de in vivo lengte en diameter metingen in de ontwikkelende arteriolaire vaatboom van het CAM (dag 7-14), kon de weerstand berekend worden. De berekende weerstand van de CAM arteriolaire vaatboom daalde met 2% in de periode dag 7-10, en daalde 12% in de periode dag 10-14. Topologische analyse van deze vaatboom toonde aan dat het groeiproces initieel gedomineerd werd door segmentale groei, maar later in de ontwikkeling door terminale groei. Gebaseerd op deze gegevens werd geconcludeerd dat de veranderingen in weerstand gedurende de periode dag 7-10 mogelijk verklaard kunnen worden door het topologische groei patroon, terwijl de veranderingen in weerstand gedurende de periode dag 10-14 afhankelijk zijn van een arteriolaire lumen diameter toename. Er wordt gepostuleerd dat de verschillen in topologisch groei patroon veroorzaakt worden door een tijdsafhankelijk bijdrage van transmurale druk (vroeg fase) en flow of metabole adaptatie (late fase) aan vaatgroei.

Het proefschrift wordt besloten (hoofdstuk 8) met een algemene beschouwing over de mogelijke betrokkenheid van het renine-angiotensine systeem in vaatgroei. Tevens worden de mogelijke oorzaken en implicaties van een verstoorde vaatgroei voor het ontwikkelen van essentiële hypertensie bediscussieerd.